Spectral Diagnostics Incorporated
Dosage de l'activité de l'endotoxine (EAA™)

Utilisation diagnostique in vitro

Mesure de l'activité de l'endotoxine dans des échantillons de sang total humain

Numéros de catalogue : EAA20-1, EAQC-5

Utilisation prévue : Le dosage EAA™ est un test diagnostique in vitro rapide qui utilise un anticorps monoclonal spécifique pour mesurer l'activité de l'endotoxine dans des échantillons de sang total humain prélevé sur EDTA. Employé en association avec des cultures microbiennes et d'autres tests diagnostiques pertinents (par ex. échographie, bronchoscopie ou tomodensitométrie) ce test est indiqué pour A) exclure la présence d'infections bactériennes Gram négatives. Le tests EAA™ est également indiqué pour B) en association avec d'autres informations cliniques comme les signes cliniques et les résultats d'autres tests biologiques et/ou radiographiques l'évaluation du risque de progression vers une sepsie grave chez les patients lors de la première journée d'admission dans un service de soins intensifs.

Résumé et explication : L'endotoxine ou lipopolysaccharide (LPS) est un constituant majeur de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatives et elle constitue le principal produit bactérien Gram négatif responsable de la sepsie grave[1-2]. Des niveaux élevés d'endotoxine provoquent des modifications de l'expression de plus de 300 gènes, l'activation des macrophages, des neutrophiles, des cellules endothéliales et de la cascade de coagulation, qui mènent à la cascade de la sepsie[3].

Ce dosage utilise la réponse biologique des neutrophiles présents dans le sang d'un patient vis-à-vis d'un complexe immunologique constitué d'endotoxine et d'un anticorps exogène comme mesure de l'activité de l'endotoxine chez ce patient[4]. Le dosage réagit spécifiquement avec le LPS des bactéries Gram négatives et ne présente pas de réaction croisée avec les constituants de la paroi cellulaire des bactéries Gram positives et d'autres micro-organismes.

Le dosage doit être utilisé en association avec :

A) des cultures microbiologiques conventionnelles et autres tests diagnostiques pertinents comme l'échographie, la radiographie thoracique, la bronchoscopie ou la tomodensitométrie pour faciliter « l'exclusion » d'un infection Gram négative infection en apportant rapidement des informations diagnostiques supplémentaires.

B) tous les résultats cliniques et biologiques disponibles dont le jugement du médecin afin de déterminer le risque de sepsie grave.

Principe : Le dosage EAA™ est un dispositif de test rapide qui mesure l'activité de l'endotoxine dans le sang total. Ce test est basé sur la réaction entre l'endotoxine et un anticorps spécifique anti-endotoxine. Les protéines du complément opsonisent le complexe endotoxine-anticorps. Le complexe immun opsonisé sensibilise les neutrophiles présents dans le sang pour accroître leur stimulation du métabolisme oxydatif en réponse au zymosan. La stimulation du métabolisme oxydatif des neutrophiles donne des oxydants qui réagissent avec le luminol dans le mélange réactionnel pour émettre une chimioluminescence. Cette chimioluminescence peut alors être détectée par un luminomètre compteur de photons.

Une mesure de l'activité initiale (Tube 1) en l'absence de l'anticorps anti-endotoxine spécifique permet de connaître la stimulation non spécifique du métabolisme oxydatif des neutrophiles du patient. Une mesure de contrôle supplémentaire comportant l'anticorps anti-endotoxine spécifique et un excès d'endotoxine exogène (Tube 3) permet de connaître la stimulation maximum du métabolisme oxydatif des neutrophiles du patient. La mesure test (Tube 2) comporte l'anticorps spécifique pour mesurer le niveau net de l'activité de l'endotoxine. La valeur du dosage EAA™ est calculée en normalisant la chimioluminescence dans l'échantillon de test (Tube 2) par rapport à la chimioluminescence maximum (Tube 3), en corrigeant les deux mesures de la chimioluminescence de l'activité initiale (Tube 1).

Prélèvement et préparation des échantillons : Cette procédure nécessite des échantillons de sang total prélevé sur EDTA. Les directives recommandées par le NCCLS[6] doivent être respectées lors du prélèvement, du transport et du traitement des échantillons de patient. Les échantillons doivent être recueillis dans des tubes à prélèvement sanguin contenant un anti-coagulant, l'EDTA, par ponction veineuse ou via un cathéter à demeure. En cas de prélèvement via une canule ou un cathéter artériel ou veineux à demeure, veuillez rincer les tubulures conformément aux normes de votre établissement avant de prélever le sang dans le tube approprié. Les échantillons de sang peuvent être conservés jusqu'à 180 minutes à température ambiante entre18 et 25 °C avant analyse. Le sang doit être soigneusement mélangé par inversion pendant au moins 20 à 30 secondes immédiatement avant l'analyse. Il est nécessaire de disposer d'un minimum de 2,5 ml de sang total pour réaliser le dosage du patient (1,0 ml de sang du patient) et le dosage de CQ (1,0 ml) qui peuvent être réalisés sur des échantillons indépendants.

Matériels fournis :

N° de cat.	Plateaux EAA™ *	Tests de contrôle qualité EAA™ *	Flacon de réactif EAA™ **	Mode d'emploi
EAA20-1	4	1	2	Oui
EAQC-5***	0	5	1	Oui

* Les plateaux EAA™ et les tests de CQ sont contenus dans une poche scellée. Voir ci-dessous une description du contenu de chaque type de test. ** Voir ci-dessous une description du contenu de chaque flacon.
*** Configuration de pièces d'équipement de l'EAQC-5 pour effectuer des contrôles de la qualité supplémentaires.

***Chaque plateau EAA™ contient les réactifs suivants en quantité suffisante pour réaliser 5 tests en double** :

Contenu	Étiquette
10 tubes contenant des stabilisants et du luminol-zymosan	(Tube 1)
10 tubes contenant 1,0-2,0 µg d'anticorps monoclonal murin anti-endotoxine, des stabilisants et du luminol-zymosan	(Tube 2)
10 tubes contenant 1,0-2,0 µg d'anticorps monoclonal murin anti-endotoxine, des stabilisants et du luminol-zymosan	(Tube 3)
5 tubes contenant 2,3 ng d'endotoxine (*E coli* 055:B5) et des stabilisants	(Tube LPS MAX)
5 tubes vides	(Tube Aliquot)

*** Chaque test individuel de contrôle qualité EAA™ contient les réactifs suivants** :

Contenu	Étiquette
2 tubes contenant des stabilisants et du luminol-zymosan	(Tube 1)
2 tubes contenant 1,0-2,0 µg d'anticorps monoclonal murin anti-endotoxine, des stabilisants et du luminol-zymosan	(Tube 3)
1 tube contenant 1,0-2,0 µg d'anticorps monoclonal murin anti-endotoxine, des stabilisants et du luminol-zymosan	(Tube Contrôle haut)
1 tube contenant 1,0-2,0 µg d'anticorps monoclonal murin, des stabilisants et du luminol-zymosan	(Tube Contrôle bas)
1 tube contenant 2,3 ng d'endotoxine (*E coli* 055:B5) et des stabilisants	(Tube LPS MAX CQ)
1 tube vide	(Tube Aliquot CQ)

**** Chaque flacon de réactif EAA™ contient environ 70 ml de réactif EAA™ renferment de l'HBSS et de l'héparine en quantité suffisante pour une trousse.**

Conservation et stabilité du réactif : Ne pas utiliser la trousse EAA™ au-delà de sa date de péremption. Ne pas mélanger des composants provenant de trousses différentes portant des numéros de lots différents**.** Conserver la trousse EAA™ entre 2 et 8 °C ou sortir les flacons de réactif EAA™ pour les conserver entre 2 et 8 °C et les poches non ouvertes à température ambiante.

Composants du test EAA™	Température	Stabilité
Plateaux du dosage EAA™		
Non ouvert	Température ambiante (18-25 °C)	Jusqu'à la date de péremption
Ouvert, refermé hermétiquement	2 – 8 °C	30 jours Refermer hermétiquement après ouverture
Test EAA™ CQ individuel	Température ambiante (18-25 °C)	Jusqu'à la date de péremption
Réactif EAA™		
Non ouvert	2 – 8 °C	Jusqu'à la date de péremption Ne pas congeler
Flacon ouvert	2 – 8 °C	30 jours Refermer hermétiquement après ouverture Ne pas congeler

Matériels supplémentaires nécessaires:

1. Combipipette, capable de délivrer des volumes de 40 µl et 1000 µl volumes et une micropipette capable de délivrer un volume de 500 µl.
2. Embouts pour combipipette et micropipette stériles
3. Chronomètre
4. Tubes pour prélèvement sanguin sur EDTA

Avertissements et précautions générales :

ATTENTION :

Matériaux de l'appareil :

L'appareil contient des matériaux qui ne sont pas classés comme dangereux en raison de leur nature physique et chimique ou de leur concentration en solution, conformément aux réglementations OSHA fédérales (États-Unis) et de la Californie, au Système d'information sur les matières dangereuses utilisées au travail (SIMDUT, Canada), ainsi qu'à la directive 2008/98/CE du Parlement européen et du Conseil du 19 novembre 2008 relativement aux déchets, abrogeant certaines directives.

1. Relativement aux réactifs contenus dans la trousse, il n'existe aucun risque direct sur la santé reconnu.
2. Recourir aux précautions générales de laboratoire lors de la manipulation et l'entreposage des matières de l'appareil inutilisées.
3. Uniquement pour utilisation diagnostique in vitro.
4. L'EAA^{MC} contient des réactifs lyophilisés fixés sur des billes dans les tubes à essais. Dans certaines conditions (emballage endommagé, mauvais scellement des poches ou mauvaise conservation) ces réactifs peuvent se rétracter en présence d'un excès d'humidité. Ne pas utiliser les tubes qui contiennent des billes rétractées car les résultats des tests peuvent être erronés.
5. Utiliser des embouts de pipette individuels afin d'éliminer les contaminations lors du pipetage manuel des échantillons ou des contrôles.

Matériaux d'appareil usagés :

6. Respecter les précautions universelles recommandées en matière de manipulation de réactifs ou d'échantillons d'origine humaine usagés.
7. Manipuler ou éliminer les réactifs EAA et tout produit sanguin humain comme s'ils étaient potentiellement capables de transmettre des agents infectieux.
8. Ne pas pipeter les solutions avec la bouche.
9. Nettoyer immédiatement les éclaboussures avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 %.

Procédure de dosage EAA™ – Voir le mode d'emploi en Annexe A
Procédure de CQ EAA™ – Voir le mode d'emploi en Annexe B

Interprétation des résultats du dosage EAA™ :

A) Exclusion d'une infection Gram négative

Le test EAA™ est un dosage de l'activité de l'endotoxine avec une valeur seuil numérique d'exclusion d'une infection Gram négative fixée à 0,40.
Les résultats inférieurs à 0,40 (0,00-0,39) étayent l'absence d'infection Gram négative chez les patients d'un service de soins intensifs présentant une suspicion d'infection.

Comme pour tous les tests diagnostiques, chaque laboratoire doit établir sa propre valeur seuil diagnostique afin d'assurer une représentation correcte de populations spécifiques et de refléter les pratiques et les critères actuels en matière d'infections Gram négatives dans leurs établissements.

B) Évaluation du risque de sepsie grave

Les résultats ≥ 0,4 sont indicatifs d'une endotoxémie. De nombreux facteurs peuvent provoquer une élévation des niveaux circulants d'endotoxine. Il peut s'agir d'une infection Gram négative invasive et de la translocation de l'endotoxine depuis la lumière intestinale. L'endotoxine est le principal produit bactérien Gram négatif responsable du choc septique.

Un diagnostic précis des causes primaires et secondaires des endotoxémies nécessite des approches cliniques et diagnostiques afin de déterminer leurs causes exactes et les traitements appropriés.

Le dosage EAA™ est destiné à aider à l'évaluation du risque de développement chez un patient d'une sepsie grave pendant les premières heures critiques qui suivent son admission dans un service de soins intensifs, les résultats de ce test étant plus utiles quand ils sont envisagés en même temps que d'autres facteurs de risque de sepsie. Le dosage EAA™ n'est pas destiné au diagnostic différentiel d'un état septique en cours. Lors d'une étude clinique prospective, multicentrique, contrôlée (voir Performances

cliniques ci-dessous) le risque de développement d'une sepsie grave parmi les patients d'un service de soins intensifs a été étudié et les résultats de l'étude ont étayé les critères interprétatifs d'évaluation des risques suivants :

- Les patients testé le premier jour de leur admission dans le service de soins intensifs dont le résultat du dosage EAA™ était ≥ 0,60, présentaient un risque trois fois plus élevé de développer une sepsie grave au cours des 24 heures suivantes que les sujets dont le résultat du dosage EAA™ étaient < 0,40 (0,00-0,39).

Les résultats inférieurs à 0,40 unités EAA™ indiquaient un faible niveau d'activité de l'endotoxine. Des résultats de cet ordre représentaient un faible risque d'évolution vers une sepsie grave.

- La sepsie grave est un syndrome qui a plus d'une cause. De faibles niveaux d'activité de l'endotoxine ne permettent pas d'exclure la possibilité de développement d'une sepsie grave à partir de déclencheurs non endotoxémiques. Par conséquent, dans un tel contexte, les médecins doivent être encouragés à se concentrer sur les causes non endotoxémiques de la sepsie. Le dosage EAA™ doit être utilisé en association avec d'autres informations cliniques.

Des résultats compris entre 0,40 et 0,59 unités EAA™ indiquent un niveau intermédiaire d'activité de l'endotoxine et un risque élevé d'évolution vers une sepsie grave.

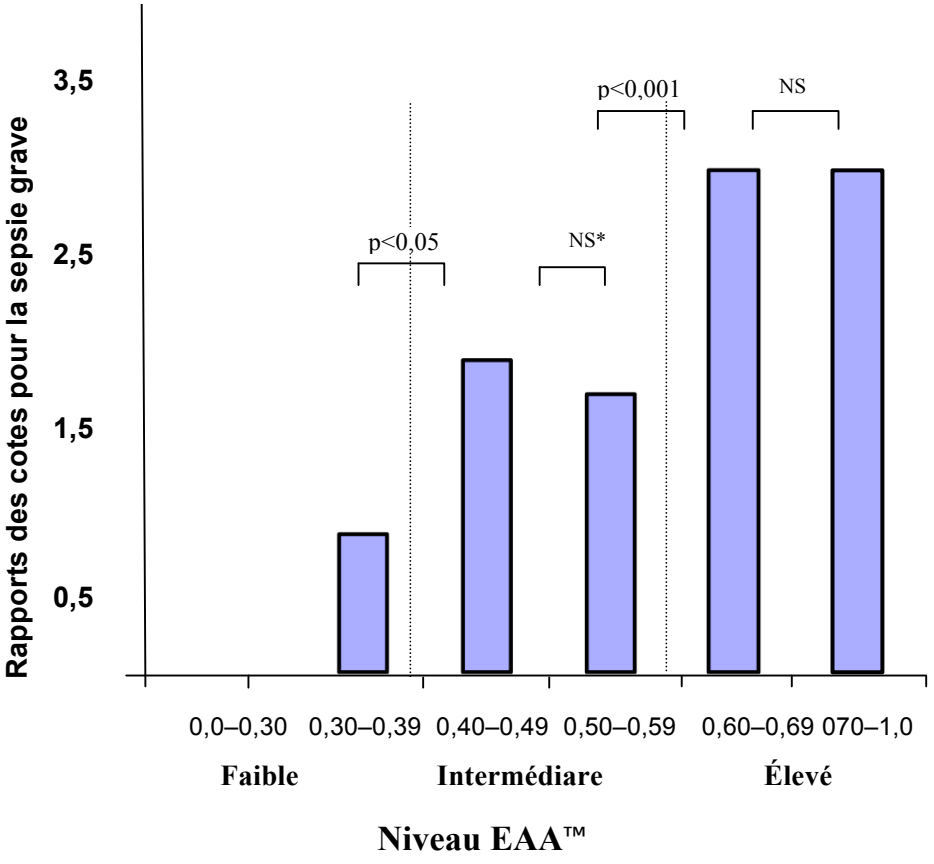
- Les patients de cette plage intermédiaire ont un rapport des cotes pour la sepsie grave de 2,0 par rapport aux patients qui présentent de résultats du dosage EAA™ faibles.

Un résultat supérieur ou égale à 0,60 unités EAA™ indique un niveau élevé d'activité de l'endotoxine.

- Les patients de cette plage élevée ont un rapport des cotes pour la sepsie grave de 3,0 par rapport aux patients qui présentent de résultats du dosage EAA™ faibles.
- Des niveaux élevés de l'endotoxine peuvent être associés à d'autres états pathologiques chez les patients gravement atteints comme le choc (9) et l'hypoxémie (10). L'endotoxémie a des propriétés pathogènes chez les patients souffrant d'une atteinte hépatique (11,12), les patients au stade post-opératoire (13, 14,15) et les patients faisant l'objet d'une circulation extracorporelle (16).

- Bien que des niveaux accrus d'endotoxine puissent ne pas constituer le seul facteur de risque de sepsie grave, leur présence à des niveaux graduels, faible (0,00-0,39 unités EAA™), intermédiaire (0,40-0,59 unités EAA™) et élevé (≥0,60 unités EAA™) est fortement associée à la présence de l'affection. La figure ci-dessous présente les intervalles choisis pour les résultats du dosage EAA™ et les rapports des cotes pour le développement d'une sepsie grave ainsi que l'évaluation statistique des différences entre les trois niveaux. De plus, la tendance parmi les trois niveaux d'endotoxémie est constante et hautement statistiquement significative (p< 0,0001).

Figure 1. Rapports des cotes pour la sepsie grave et le niveau d'endotoxémie



*NS= différences non statistiquement significatives entre les rapports des cotes des déciles des niveaux EAA™ à l'intérieur du niveau EAA™ intermédiaire et à l'intérieur du niveau EAA™ élevé. Remarquez, cependant, que les différences entre les niveaux EAA™, faible versus intermédiaire et intermédiaire versus élevé sont statistiquement significatives.

Limitations :

Analytiques

1. Comme pour tous les immunodosages ou réactions immunochimiques il convient de procéder avec le plus grand soin.
2. L'utilisateur doit être avertit des effets possibles sur les résultats des interférences potentielles dues à des médicaments ou à des substances endogènes inconnues. Voir Substances interférentes ci-dessous.

Cliniques

1. Le dosage EAA™ ne doit pas être utilisé hors des services de soins intensifs car ses performances n'ont pas été validées en dehors de ce cadre.
2. Le dosage EAA™ ne doit pas être utilisé à d'autres moments que lors du premier jour d'admission dans un service de soins intensifs car ses performance n'ont pas été validées en dehors de ce cadre.
3. Des observations de résultats positifs vis-à-vis de l'endotoxine chez des patients ne présentant pas de sepsie grave ont déjà été rapportées dans des études publiées.
4. Les résultats du dosage EAA™ doivent être évalués dans le contexte des résultats biologiques du patient et en fonction de son état clinique global. Dans le cas où les résultats biologiques sont en désaccord avec le tableau clinique ou les antécédents du patient, des tests supplémentaires doivent être mis en œuvre.

Résultats attendus :

A) Exclusion d'une infection Gram négative

Le test EAA™ est un dosage de l'activité de l'endotoxine avec une valeur seuil numérique d'exclusion d'une infection Gram négative fixée à 0,40. Les résultats inférieurs à 0,40 (0,00-0,39) étayent l'absence d'infection Gram négative chez les patients d'un service de soins intensifs présentant une suspicion d'infection.

L'essai Multi-Center Endotoxin Detection in Critical illness (MEDIC) est une étude observationnelle, multicentrique, prospective, réalisée dans 10 services de soins intensifs (ICU) d'hôpitaux universitaires en Amérique du Nord et en Europe. L'essai MEDIC a été mis en œuvre afin d'évaluer les performances du dosage EAA™ par rapport à la détermination par culture des infections Gram négatives invasives. Les patients éligibles étaient ceux qui présentaient une suspicion clinique d'infection plus une prescription de culture diagnostique.
Les infections Gram négatives invasives ont été identifiées par culture chez 36 sur 465 (8 %) des patients évaluables. En utilisant une valeur seuil < 0,40 pour le dosage EAA™, le test a donné les résultats suivants :

	Pas d'infection gram négative	Infection gram négative répondant aux critères *CEC	Total
< 0,40 (0,00-0,39) EAA™	134	8	142
≥ 0,40 (0,40-1,00) EAA™	295	28	323
Total	429	36	465

NPV (IC à 95 %)	94,4 (88,4 – 97,8)
Sensibilité (IC à 95 %)	77,8 (56,3 – 92,1)
Spécificité (IC à 95 %)	31,2 (25,3 – 37,7)
PPV (IC à 95%)	8,7 (5,8 – 12,3)

*Comité d'évaluation clinique : Toutes les cultures présentant une croissance bactérienne ont été examinées par un comité (CEC) à l'aide de règles explicites d'adjudication afin d'obtenir un accord en ce qui concerne la présence ou l'absence d'infection.

Comme pour tous les tests diagnostiques, chaque laboratoire doit établir sa propre valeur seuil diagnostique afin d'assurer une représentation correcte de populations spécifiques et de refléter les pratiques et les critères actuels en matière d'infections Gram négatives dans leurs établissements.

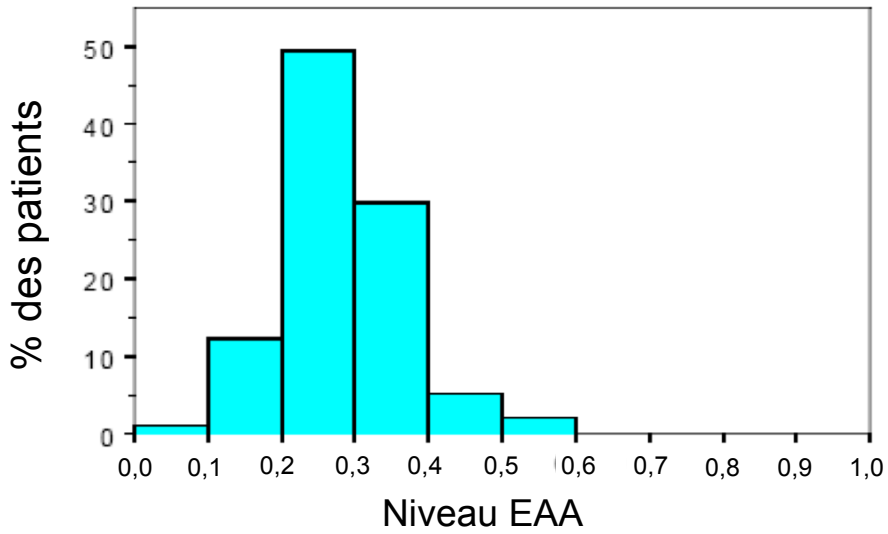
Les résultats ≥ 0,40 sont indicatifs d'une endotoxémie. De nombreux facteurs peuvent provoquer une élévation des niveaux circulants d'endotoxine.
Il peut s'agir d'une infection Gram négative invasive et de la translocation de l'endotoxine depuis la lumière intestinale.
L'endotoxine est le principal produit bactérien Gram négatif responsable du choc septique. Au cours de l'étude MEDIC, les patients qui présentaient un niveau d'EAA™ ≥ 0,60 ont eu un rapport des cotes pour la sepsie grave de 3,0 (voir Évaluation des risques de sepsie grave ci-dessous).

Un diagnostic précis des causes primaires et secondaires des endotoxémies nécessite des approches cliniques et diagnostiques afin de déterminer leurs causes exactes et les traitements appropriés.

B) Évaluation du risque de sepsie grave

Le dosage EAA™ est une évaluation de l'activité de l'endotoxine comportant trois intervalles d'endotoxémie : faible < 0,40 (0,00 0,39) unités EAA™, intermédiaire 0,40-0,59 unités EAA™ et élevé ≥ 0,60 unités EAA™.

Figure : Histogramme des valeurs de l'EAA™ chez des sujets sains



Un niveau d'EAA™ de 0,40 représente une valeur supérieure de +2 écart-types au-dessus de la moyenne. Dans une population de sujets sains, 93 % d'entre eux ont un niveau d'EAA™ inférieur à cette valeur. Il est donc raisonnable de supposer qu'un niveau de 0,40 représente une valeur seuil conservatrice au-dessous de laquelle la plupart des individus doivent être « sains ». De plus, un niveau d'EAA™ de 0,60 représente une valeur supérieure de +4 écart-types au-dessus de la moyenne. Des variations individuelles de la valeur initiale peuvent se produire. De façon inattendue, de légères élévations de l'endotoxine ont été rapportées dans certains états ambulatoires comme des périodontites[7] ou chez les fumeurs de cigarettes. Aucun des volontaires n'a présenté un niveau d'EAA™ mesuré ≥ 0,60. Comme tel, ceci représente une valeur significative au-dessus duquel le niveau d'EAA™ peut être indicatif d'un processus indésirable sous-jacent.

Performances cliniques : L'essai Multi-Center Endotoxin Detection in Critical illness (MEDIC) est une étude observationnelle, multicentrique, prospective, réalisée dans 10 services de soins intensifs (ICU) d'hôpitaux universitaires en Amérique du Nord et en Europe. La présence d'une endotoxémie a été évaluée lors du premier jour de séjour des patients dans le service de soins intensifs afin de déterminer les chances de développer une sepsie grave au cours des 24 heures qui suivent l'admission dans le service de soins intensifs. La population cible de l'Étude d'évaluation des risques comportait tous les patients éligibles enrôlés dans l'essai MEDIC lors du premier jour d'admission dans le service de soins intensifs admission qui disposaient d'échantillons évaluables, N=857. Les données démographiques des patients sont présentées dans le tableau suivant.

Données démographiques et caractéristiques initiales des patients analysés

Caractéristiques	
Âge : moyenne (E-T) médiane [IQR]* années	60 (±17) 62 [49, 74]
Sexe (% masculin)	58,9 %
Race (% non caucasien)	15,8 %
APACHEII : moyenne (E-T) médiane [IQR]*	15,2 (±9,5) 14 [8, 21]
Durée du séjour dans l'ICU : moyenne (E-T) médiane [IQR]*	5,4 (± 10,9) 2,0 [1, 5]
Durée du séjour à l'hôpital : moyenne (E-T) médiane [IQR]*	23,3 (± 27,0) 1,0 [7,29]
Mortalité dans l'ICU	13,3 %
Mortalité à l'hôpital	19,9 %

*IQR = étendue interquartile

La population des patients en soins intensifs constitue l'environnement clinique le plus approprié pour l'évaluation du dosage EAA™. L'utilité du dosage EAA™ n'a été validée que pour la population des patients en soins intensifs. La relation entre les niveaux d'endotoxine et le risque de développement d'une sepsie grave chez les patients gravement malades est destinée à apporter un complément aux informations cliniques actuellement disponibles afin d'établir le risque de sepsie grave au cours du premier jour d séjour dans les services de soins intensifs.

Résultats du dosage EAA™ et risque de sepsie grave au cours des 24 premières heures dans l'ICU

Résultats du dosage EAA™	Incidence des sepsies graves au cours des 24 premières heures	Rapport des cotes	IC à 95 %	Chi^2, valeur de p
Faible < 0,40 (0,00-0,39)	4,9 %			
Intermédiaire 0,40-0,59	9,2 %	2,0	1,02-3,78	4,3, <0,05
Élevé ≥ 0,60 (0,60-1,00)	13,4 %	3,0	1,65-5,41	14,2, <0,001

Parmi les 857 patients évalués, 214 patients présentaient des valeurs de l'EAA™ élevées (≥ 0,60) au Jour 1 mais n'ont pas évolué vers une sepsie grave au Jour 1. Les états cliniques pertinents susceptibles d'avoir contribué à l'endotoxémie chez ces patients sont les suivants : choc (n=30), hypoxémie (n=127), insuffisance rénale chronique (n=25) et état post-opératoire (n=54). Certains patients ont présenté plus d'un de ces états.

Performances :
Substances interférentes :

- Des taux de triglycérides jusqu'à 1000 mg/dl n'interfèrent pas avec le dosage EAA™. À des concentrations en triglycérides supérieures à 1500 mg/dl une diminution des valeurs de l'EA a été observée. Les échantillons fortement lipémiques ne doivent pas être utilisés pour les dosages EAA™.
- L'hémoglobine à 100 mg/dl n'interfère pas avec le dosage EAA™ alors que des taux de 500 mg/dl atténuent les valeurs faibles du dosage EAA™ de moins de 0,03 unités et les valeurs élevées du dosage EAA™ de 15 % en moyenne. Les échantillons fortement hémolysés ne doivent pas être utilisés pour les dosages EAA™.
- Une perfusion exogène d'albumine exempte d'endotoxine chez des patients à des niveaux qui font augmenter la concentration plasmatique en albumine de plus de 10 g/l au-dessus de la limite normale supérieure sont susceptibles de faire diminuer les valeurs du dosage EAA™. Les échantillons provenant de patients porteurs d'anomalies hyperprotéiniques ou recevant des traitements par l'albumine doivent faire l'objet d'une mesure des protéines afin de s'assurer que les concentrations élevées en albumine ne constituent par une source d'interférences avec le dosage EAA™.

Précision : Les échantillons de sang total, nets et additionnés d'endotoxine endogène, ont été analysés à huit reprises chacun sur trois instruments La répétabilité et la reproductibilité ont été calculées conformément aux procédures du NCCLS, EP5-A.

Échantillon	N	Moyenne EAA	Répétabilité 1E-T	% CV	Totale 1E-T	Précision % CV
1	24	0,11	0,015	14	0,023	22
2	24	0,20	0,030	15	0,029	14
3	24	0,30	0,043	15	0,042	14
4	24	0,50	0,059	12	0,064	13
5	24	0,52	0,036	7	0,034	6
6	24	0,59	0,050	8	0,046	8

Sensibilité analytique : La précision totale a été utilisée pour estimer la sensibilité de la méthode EAA™ sur un échantillon de patient faiblement présentant un niveau faible. Vingt-quatre déterminations EAA™ ont été réalisées sur un échantillon de patient unique présentant un niveau faible de EAA™ ; huit mesures sur chacun des trois instruments. Le niveau moyen du dosage EAA™ du patient était de 0,11 avec un E-T de 0,023. Le sensibilité, calculée par la méthode des deux écart- types, a été ainsi estimée à 0,046 unités EAA™.
Spécificité analytique : L'endotoxine provenant des bactéries Gram négatives, *E. coli* 055:B5, *P. aeruginosa, K. pneumoniae, S. enterides, E. coli* 0127:B8, *S. marcescens* et *S. flexnevi* a induit une augmentation des niveaux de EAA™ de 0,10 à 0,52 quand 100 pg/ml d'endotoxine ont été ajoutés à un échantillon de sang dont le niveau net moyen était de 0,33 unités EAA. De plus, des préparations de *V. cholerae* LPS ont produit des augmentations statistiquement significatives des valeurs de EA. Aucune réactivité n'a été observée jusqu'à 2000 pg/m d'extraits d'acide lipotéichoïque provenant des souches suivantes de bactéries Gram positives :

S. mutans, S. pyogenes, S. sanguis, S. faecalis, S. aureus et *B. subtilis*. De même, il n'a été observé aucune réactivité avec le mannane des levures jusqu'à 2000 pg/ml et avec les extraits de paroi cellulaire de *C. albicans* et *A. fumagatis*.
EPIBv2-04

Linéarité des résultats : Le dosage a été optimisé pour être hautement sensible à de faibles niveaux d'endotoxine et pour résister à un effet crochet à haute dose induit par des niveaux extrêmement élevés d'endotoxine. Par conséquent, la courbe présente un aspect curvilinéaire. Quand les échantillons de patient contiennent de faibles niveaux d'endotoxine, de petites augmentations de ces niveaux vont se traduire par des accroissement significatifs des valeurs du dosage EAA™. Il n'est pas nécessaire de procéder à des dilutions pour les échantillons qui ont généré des valeurs élevées du dosage EAA™.

Références bibliographiques :

1. Van Deventer SJH, et al. Endotoxemia: an early predictor of septicemia in febrile patients. The Lancet (March 19) 1988; 605-609.
2. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, et al. Septic shock in humans: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. Ann Int Med 1990; 113: 227-242.
3. Zhao B, Bowden RAS, Stavchansky SA, et al. Human endothelial cell response to gram-negative lipopolysaccharide assessed with cDNA microarrays. Am J Cell Physiol 2001; 281: C1587-C1595.
4. Romaschin AD, et al. A rapid assay of endotoxin in whole blood using autologous neutrophil dependent chemiluminescence. J. of Immunology. Methods 1998; 212: 169-185.
5. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 711 East Lancaster Avenue, Villanova, PA 19085) Document # M29-A Protection of Laboratory Worker from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissues; Approved Guideline, 1997.
6. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 711 East Lancaster Avenue, Villanova, PA 19085) Document # H3-#a Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture – Third Edition; Approved Standard, 1991.
7. Geerts SO, Nys M, De MP, et al. Systemic release of endotoxins induced by gentle mastication: association with periodontitis severity. J Periodontal 2002; 73(1): 73-78.
8. Hasday JD, Bascom R, Costa JJ, et al. Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. Chest 1999; 115(3): 829-835.
9. Van Langevelde, P, Joop, K, van Loon, et al. Endotoxin, cytokines, and procalcitonin in febrile patients admitted to the hospital: identification of subjects at high risk of mortality. CID 2000; 31(December): 1343- 1348.
10. Murphy DB, Cregg N, Tremblay L, et al. Adverse ventilatory strategy causes pulmonary-to-systemic translocation of endotoxin. Am J Respir Crit Care Med 2000; Jul 162(1): 27-33.
11. Bion JF, Badger I, Crosby HA, et al. Selective decontamination of the digestive tract reduces Gram-negative pulmonary colonization but not systemic endotoxemia in patients undergoing elective liver transplantation. Crit Care Med 1994; 22: 40-49.
12. Gaeta GB, Perna P, Adinolfi LE et al. Endotoxemia in a series of 104 patients with chronic liver diseases: prevalence and significance. Digestion 1982; 23: 239-244.
13. Soong CV, Blair PHB, Halliday ML et al. Endotoxemia, the generation of the cytokines and their relationship to intramucosal acidosis of the sigmoid colon in elective abdominal aortic aneurysm repair. Eur J Vasc Surg 1993; 7: 534-539.
14. Roumen RMH, Frieling JTM, van Tits HWHJ et al. Endotoxemia after major vascular operations. J Vasc Surg 1993; 18:853-857.
15. Schlag G, Redl H, Dinges HP, Davies J. Sources of endotoxin in the posttraumatic setting. Bacterial Endotoxins: Cytokine Mediators and New Therapies for Sepsis: 121-134.
16. Jansen PGM, Te Velthuis H, Oudemans-Van Straaten HM, et al: Perfusion-related factors of endotoxin release during cardiopulmonary bypass. Eur J Cardio-thorac Surg 1994; 8:125-129.

UNIQUEMENT POUR UTILISATION DIAGNOSTIQUE IN VITRO

CE

Fabriqué par :
Spectral Diagnostics Inc.
135 The West Mall
Toronto, ON Canada
M9C 1C2
(416)-626-3233
TÉLÉCOPIE : (416)-626-7383
www.spectraldx.com

Authorized Representative :
Dr. Rolf Keck
Ritterstrasse 25,
D-77977 Rust/Baden
Germany
+49 -782-286-5111
Fax : +49 -782-286 5113